小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶测定条件的优化及其对六种常用杀虫剂的敏感性

廖秀丽[1]，罗术东[1]，伍　翔[2]，吴　杰[1,*]
（1. 中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室，北京 100093；
2. 中化化工科学技术研究总院，北京 100083）

摘要：小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 是我国优势熊蜂种群之一，因其易于饲养、群势较强且授粉性能优良而成为我国设施农业常用优良授粉蜂种，但常受到以乙酰胆碱酯酶（AChE）为靶标酶的有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的危害。为合理规避这两类杀虫剂对熊蜂的危害，同时也为完善熊蜂授粉配套技术和保护野生熊蜂资源提供理论基础，本研究利用正交试验对小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶活性的测定条件进行了优化，并明确了 6 种常用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂对乙酰胆碱酯酶活性的影响。结果表明：各测定因素对小峰熊蜂乙酰胆碱酯酶活性测定影响的大小顺序依次为：酶浓度 > pH > 温度 > 底物浓度 > 反应时间；小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶活性的最适反应条件为：酶浓度 0.25 g 蛋白质/L，底物浓度 0.8 mmol/L，pH 值 7.5，温度 40℃，反应时间 5 min。毒死蜱、三唑磷、丙溴磷、异丙威、仲丁威和残杀威 6 种杀虫剂对小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶离体抑制作用均呈现明显的剂量-效应关系，其抑制中浓度 IC_{50} 分别为 0.39，1.79，0.42，0.04，0.43 和 0.63 mmol/L。这 6 种杀虫剂对小峰熊蜂 AChE 抑制作用的强弱依次为：异丙威 > 毒死蜱 > 三唑磷 > 仲丁威 > 残杀威 > 丙溴磷，即小峰熊蜂对异丙威最敏感，而对丙溴磷的敏感性最弱。

关键词：小峰熊蜂；乙酰胆碱酯酶；正交试验；最佳测定条件；杀虫剂敏感性；抑制中浓度
中图分类号：Q965.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)12-1361-07

Optimization of conditions for assaying activity of acetylcholinesterase in *Bombus hypocrita* (Hymenoptera: Apidae) and its sensitivity to six common insecticides

LIAO Xiu-Li[1], LUO Shu-Dong[1], WU Xiang[2], WU Jie[1,*] (1. Key Laboratory for Insect-Pollinator Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. Central Research Institute of China Chemical Science and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: *Bombus hypocrita* (Hymenoptera: Apidae) is one of the dominant bumblebees in China, and is widely used as one of the most crucial pollinators in greenhouse due to easy mass-rearing, strong population and effective pollinating performance. However, it is often threatened by organophosphate and carbamate insecticides which are widely used in China, as these insecticides can inhibit the acetylcholinesterase (AChE) activity in insects. In order to avoid harm to bumblebees by these insecticides and improve the pollination technology and conservation of bumblebees, we optimized the reaction conditions to assay the AChE activity from the head of *B. hypocrita*, and evaluated the effect of six common organophosphate and carbamate insecticides on the AChE activity. The results showed that the optimal conditions are as follows: enzyme concentration 0.25 g protein/L, substrate concentration 0.8 mmol/L, pH 7.5, reaction temperature 40℃, and reaction time 5 min. The inhibition of six insecticides to AChE from *B. hypocrita* showed a dosage effect. The medium inhibition concentration (IC_{50}) values for chlorpyrifos, profenofos, triazophos, isoprocarb, bassa and propoxur are 0.39, 1.79, 0.42, 0.04, 0.43 and 0.63 mmol/L, respectively. The inhibitory effects of six insecticides to AChE from high to low are in the following order: isoprocarb > chlorpyrifos > triazophos > bassa > propoxur >

基金项目：国家蜜蜂产业技术体系建设专项经费(CARS-45)；农业农村资源等监测统计经费(1251017220)；国家“948”项目(2011-S1)；公益性行业(农业)科研专项(201203080)

作者简介：廖秀丽，女，1986 年生，江西萍乡人，硕士，研究方向为授粉昆虫毒理学，E-mail：liaoxiuli-1003@163.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：apis@vip.sina.com

收稿日期 Received：2011-07-29；接受日期 Accepted：2011-10-10

profenofos, and *B. hypocrita* is more sensitive to isoprocarb than to the other five insecticides.

Key words: *Bombus hypocrita*; acetylcholinesterase; orthogonal experiment; optimal assay conditions; insecticide sensitivity; medium inhibition concentration (IC_{50})

熊蜂是重要的传粉昆虫，也是设施农业理想的授粉昆虫。据统计，目前全球已知熊蜂种类约 250 种，我国已知熊蜂种类 115 种，是全世界熊蜂种类最多的国家(吴杰等，2009；Williams *et al.*，2010)。中国农业科学院蜜蜂研究所多年的繁育与授粉试验表明，小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 因其易于人工饲养、环境适应能力强、群势强大和授粉性能优越等特点而极具商业化前景，具有很好的推广与应用价值(吴杰等，2007；安建东等，2010)。同时，小峰熊蜂也是许多濒危植物的重要传粉者，在生物多样性的维持与生态系统的维护中具有重要作用(安建东等，2008，2010；彭文君等，2009)。

然而，农药等环境有害物质的施用威胁到熊蜂等传粉昆虫的生存(Morandin and Winston，2003；Morandin *et al.*，2005；Wu *et al.*，2009；Besard *et al.*，2010；Gradish *et al.*，2010)。近几十年来，全球范围内呈现出熊蜂等传粉昆虫的数量和种类急剧下降的现象，而农药的施用被认为是其主要原因之一(Biesmeijer *et al.*，2006；Colla and Packer，2008；Williams and Osborne，2009；Brittain *et al.*，2010)，国内虽无相关报道，但毫无疑问，农药的广泛使用也势必严重威胁到熊蜂等传粉昆虫的生存。有机磷(organophosphates，OPs)和氨基甲酸酯(carbamates，CBs)类杀虫剂是我国目前温室和大田常用农药品种之一，因而，了解 OPs 和 CBs 类杀虫剂对熊蜂的危害对于合理规避这 2 类杀虫剂对熊蜂的危害具有重要的意义。

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase，AChE，EC.3.1.1.7)广泛存在于动植物的组织和动物体液中。它是生物神经传导中的一种关键性的酶，能迅速地将胆碱突触间隙内的神经递质乙酰胆碱(acetylcholine，Ach)水解为乙酸(A)和胆碱(Ch)，从而终止神经递质对突触后膜的兴奋作用，保持神经突触传导的正常进行。AChE 是 OPs 和 CBs 类杀虫剂的主要靶标酶(Hama and Hosoda，1983)，这两类杀虫剂通过与其活性位点的丝氨酸残基形成共价键而抑制 AChE。AChE 被杀虫剂抑制后，使 ACh 在突触处积累，过量的 ACh 造成去极化阻断，从而抑制了正常的神经冲动的传递，最终导致生物体死亡(Fournier and Mutero，1994)。尽管前人对其他昆虫 AChE 的研究较多，其测定方法也较成熟，但是不同生物体的 AChE 的最佳测定条件不同，不同农药对不同生物体 AChE 的抑制效果也不一样(Gorun *et al.*，1978；高希武，1987；刘洪霞等，2005；张莹等，2005a，2005b；汤方等，2008)。因此，为合理保护和利用小峰熊蜂，正确评价 OPs 和 CBs 类杀虫剂对小峰熊蜂的影响，本研究在前期研究基础上，以小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶为研究对象，采用正交试验方法明确了不同测定因素对小峰熊蜂头部 AChE 的影响及其最佳测定条件。同时，本研究还测定了毒死蜱、三唑磷、丙溴磷、异丙威、仲丁威和残杀威 6 种常用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂对小峰熊蜂头部 AChE 活性的抑制作用，以期为作物蜂授粉期间农药的安全施用和熊蜂资源的保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试小峰熊蜂取自中国农业科学院蜜蜂研究所熊蜂繁育室，于 2010 年 4 月初从华北地区采集野生越冬出蛰的小峰熊蜂蜂王，带回繁育室进行人工饲养繁殖，饲养温度为 29±1℃，相对湿度为 60%±5%，于黑暗条件下采用 50% 的糖水和杏花花粉进行饲喂。

1.2 供试化学试剂

碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide，ATCh)和 5，5′-二硫双硝基苯甲酸(5，5′-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid，DTNB)为 Sigma 公司产品；其他试剂均为国产分析纯。90.1% 辛硫磷，河北省邢台市农药有限公司产品；97% 毒死蜱和 85.2% 三唑磷，浙江新农化工股份有限公司产品；94.4% 丙溴磷，浙江永农化工有限公司产品；98% 异丙威、97.5% 仲丁威和 97% 残杀威，湖南海利化工股份有限公司产品。以上药品全部由中化化工科学技术研究总院友情提供。

1.3 酶液提取方法

每次取 12 头小峰熊蜂工蜂，将头部放入预冷的不同 pH 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(含 0.1% Triton X-100)中冰浴匀浆，头部匀浆液在 4℃，

15 000 g 离心 20 min，取上清液作为酶源。采用改进的 Ellman 方法测定乙酰胆碱酯酶（AChE）活性（高希武，1987）。取待测酶液 0.1 mL 与 0.1 mL ATCh 混匀，不同处理按照正交组合中的要求分别进行不同时间的反应后，加入 0.9 mL 显色剂（DTNB）并终止反应，用紫外分光光度计在 412 nm 处测定吸光（OD）值。重复 3 次。

$$\text{AChE 比活力}(\mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}) = \frac{\Delta OD/mg \times V}{\varepsilon \times L}$$

其中：ΔOD 为 1 min 内吸光度的变化值，V 为反应总体积（单位为 mL），ε 为产物与 DTNB 络合物的摩尔消光系数 = 13 600 L/mol·cm；L 为比色杯的光程 1 cm，mg 为酶液中蛋白质含量。

蛋白质含量的测定参考 Bradford 法（Bradford，1976）。

1.4　正交试验设计

本试验中研究的因素是影响酶促反应的一些主要因素，包括酶浓度、底物浓度、pH、反应温度和反应时间（表 1），采用的正交表为 $L_{25}(5^6)$。每处理重复 3 次。

表 1　正交试验中的因素及水平

Table 1　Experimental factors and their levels for orthogonal experiment

水平 Level	A	B	C	D	E
1	0.25	0.4	6.0	20	5
2	0.50	0.6	6.5	25	10
3	0.75	0.8	7.0	30	15
4	1.00	1.0	7.5	35	20
5	1.25	1.2	8.0	40	25

1 –5：各因素的 5 个水平 Five levels of factors；A：乙酰胆碱酯酶浓度（g 蛋白质/L）AChE concentration（g protein/L）；B：底物浓度 Substrate concentration（mmol/L）；C：pH；D：反应温度 Reaction temperature（℃）；E：反应时间 Reaction time（min）. 下表同 The same for the following tables.

1.5　杀虫剂与小峰熊蜂 AChE 的剂量-效应关系

在前一研究所测得的最佳条件下，以小峰熊蜂头部 AChE 为酶源，将不同浓度杀虫剂与酶液在 40℃水浴中温育 5 min，再分别与底物混合，按前文所述测定其残留酶活性，抑制率计算公式为：

$$\text{抑制率} = \left[1 - \left(\frac{\text{试验处理组酶活性}}{\text{对照组酶活性}}\right)\right] \times 100\%$$

以不同的杀虫剂浓度对小峰熊蜂 AChE 抑制百分率，计算抑制中浓度（IC_{50}）。每处理重复 3 次。

1.6　统计与分析

采用正交设计助手软件和 SAS（V8）统计软件对正交试验结果进行极差分析、方差分析及 Duncan 氏多重比较，得出各因素对酶活性测定的影响程度及 AChE 最佳测定条件。$P \leqslant 0.05$ 表示差异显著，$P \leqslant 0.01$ 表示差异极显著。同时，利用 Polo 软件进行 IC_{50} 的计算。

2　结果与分析

2.1　小峰熊蜂头部 AChE 测定条件的优化

正交试验得到的不同因素不同水平下小峰熊蜂头部 AChE 比活力值及计算结果见表 2。

正交试验结果的极差在一定程度上表明了不同因素不同水平对试验结果的影响。对表 2 所测得的试验数据的极差分析结果表明，酶浓度的极差最大，达 0.50，表明该因素对测定小峰熊蜂 AChE 比活力的影响最大（表 3），而反应时间对比活力测定的影响最小（极差为 0.17）。因此各因素对小峰熊蜂 AChE 比活力测定影响的大小顺序为：酶浓度 > pH > 温度 > 底物浓度 > 反应时间。同时，极差分析结果还表明，酶浓度第 1 水平，底物浓度第 3 水平，pH 第 4 水平，温度第 5 水平和反应时间第 1 水平均值最大，分别为各因素的最佳测定条件（表 3）。

同时，我们还对试验结果进行了进一步的方差分析和 F 检验。结果表明，5 个因素对小峰熊蜂 AChE 比活力的测定差异均达到极显著水平，其影响大小顺序与用极差分析得出的结果完全一致（表 3，表 4）。

由于 F 检验表明 5 个因素对小峰熊蜂 AChE 比活力的测定均达到极显著水平（表 4），因此需要进行因素内各水平的差异性检验，以便从中选出测定小峰熊蜂 AChE 比活力的最佳条件组合。结果同样表明，各因素条件下，酶浓度第 1 水平，底物浓度第 3 水平，pH 第 4 水平，温度第 5 水平，反应时间第 1 水平显著高于其他水平，对结果影响也最大，极差分析结果得以验证（表 5）。

综合以上极差分析和方差分析的结果可知：5 个因素对小峰熊蜂头部 AChE 的比活力均有影响，因此在测定时都应加以控制，酶浓度对比活力测定的影响最大，反应时间的影响最小。同时，试验结果还表明：小峰熊蜂头部 AChE 活性测定的最佳条件为酶浓度为 0.25 g/L，底物浓度为 0.8 mmol/L，pH 值为 7.5，温度为 40℃和反应时间为 5 min。

表 2 不同处理组合下小峰熊蜂头部 AChE 的比活力值

Table 2 AChE activity from the head of *Bombus hypocrita* assayed in $L_{25}(5^6)$ orthogonal experiment

编号 No.	组号 Run	A	B	C	D	E	AChE 比活力(10^{-5} mmol/min · mg) Specific activity of AChE
1	$A_1B_1C_1D_1E_1$	0.25	0.4	6.0	25	5	32.35 ± 4.89
2	$A_1B_2C_2D_2E_2$	0.25	0.6	6.5	30	10	35.26 ± 1.17
3	$A_1B_3C_3D_3E_3$	0.25	0.8	7.0	35	15	45.58 ± 1.30
4	$A_1B_4C_4D_4E_4$	0.25	1.0	7.5	30	20	91.45 ± 4.58
5	$A_1B_5C_5D_5E_5$	0.25	1.2	8.0	45	25	76.78 ± 3.58
6	$A_2B_1C_2D_3E_4$	0.50	0.4	6.5	35	20	13.14 ± 0.28
7	$A_2B_2C_3D_4E_5$	0.50	0.6	7.0	40	25	13.34 ± 0.22
8	$A_2B_3C_4D_5E_1$	0.50	0.8	7.5	45	5	85.74 ± 1.71
9	$A_2B_4C_5D_1E_2$	0.50	1.0	8.0	25	10	20.54 ± 1.48
10	$A_2B_5C_1D_2E_3$	0.50	1.2	6.0	30	15	11.50 ± 0.57
11	$A_3B_1C_3D_5E_2$	0.75	0.4	7.0	45	10	11.91 ± 0.46
12	$A_3B_2C_4D_1E_3$	0.75	0.6	7.5	25	15	11.50 ± 0.63
13	$A_3B_3C_5D_2E_4$	0.75	0.8	8.0	30	20	10.62 ± 0.42
14	$A_3B_4C_1D_3E_5$	0.75	1.0	6.0	35	25	7.34 ± 0.29
15	$A_3B_5C_2D_4E_1$	0.75	1.2	6.5	40	5	20.83 ± 3.40
16	$A_4B_1C_4D_2E_5$	0.10	0.4	7.5	30	25	2.70 ± 0.02
17	$A_4B_2C_5D_3E_1$	0.10	0.6	8.0	35	5	14.64 ± 0.81
18	$A_4B_3C_1D_4E_2$	0.10	0.8	6.0	40	10	8.03 ± 0.12
19	$A_4B_4C_2D_5E_3$	0.10	1.0	6.5	45	15	10.66 ± 0.06
20	$A_4B_5C_3D_1E_4$	0.10	1.2	7.0	25	20	6.65 ± 0.12
21	$A_5B_1C_5D_4E_3$	1.25	0.4	8.0	40	15	2.75 ± 0.04
22	$A_5B_2C_1D_5E_4$	1.25	0.6	6.0	45	20	3.44 ± 0.02
23	$A_5B_3C_2D_1E_5$	1.25	0.8	6.5	25	25	3.54 ± 0.05
24	$A_5B_4C_3D_2E_1$	1.25	1.0	7.0	30	5	11.57 ± 0.40
25	$A_5B_5C_4D_3E_2$	1.25	1.2	7.5	35	10	7.67 ± 0.11

比活力为平均值 ± 标准差；按 $L_{25}(5^6)$ 正交表安排的 25 个处理组合进行试验，下标代表各因素的不同水平。The specific activity is mean ± *SD*. The orthogonal experiment was designed by orthogonal design for 5 (number of factors) × 25 (number of runs), and the subscripts represent different levels of each factor.

2.2 6 种杀虫剂与小峰熊蜂 AChE 的剂量-效应关系

研究发现，小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶的活性在毒死蜱、丙溴磷和三唑磷 3 种有机磷杀虫剂及异丙威、仲丁威和残杀威 3 种氨基甲酸酯类杀虫剂的作用下，呈现较好的线性剂量-效应关系(表 6)，对不同杀虫剂的剂量及其活性的回归分析发现，毒死蜱、丙溴磷、三唑磷、异丙威、仲丁威和残杀威 6 种杀虫剂对乙酰胆碱酯酶活性的抑制中浓度(IC_{50})分别为 0.39，1.79，0.42，0.04，0.43 和 0.63 mmol/L，由此可见，这 6 种杀虫剂对小峰熊蜂 AChE 抑制作用的强弱分别为：异丙威 > 毒死蜱 > 三唑磷 > 仲丁威 > 残杀威 > 丙溴磷。

3 讨论

乙酰胆碱酯酶的测定条件因不同生物体甚至同一生物体的不同部位而异，通常而言，酶浓度、底物浓度、pH 值、反应时间和反应温度是影响酶活性测定的重要因素。酶浓度对测定的影响比较复杂，酶浓度的增加不一定会使酶活性也增加；当底物(如乙酰胆碱或硫代乙酰胆碱)浓度达到一定高度时，乙酰胆碱酯酶的活性会被其底物所抑制；pH 过大(过碱)或过小(过酸)都可能使酶蛋白变性而失去活性，也会使酶活性中心的必需基团改变解离程度，而且当 pH 高于 8.0 时，DTNB 会发生自发的水解，另外，在碱性条件下，大多数有机磷和氨基

表 3　正交试验极差分析

Table 3　Range analysis of the orthogonal experiment

	乙酰胆碱酯酶比活力 (10^{-3} mmol/min · mg) AChE specific activity				
	A	B	C	D	E
K_1	8.44	1.89	1.88	2.24	4.95
K_2	4.33	2.35	2.50	2.15	2.50
K_3	1.86	4.61	2.67	2.65	2.46
K_4	1.28	4.25	5.97	4.09	3.76
K_5	0.87	3.70	3.76	5.66	3.11
k_1	0.56	0.13	0.13	0.15	0.33
k_2	0.29	0.16	0.17	0.14	0.17
k_3	0.12	0.31	0.18	0.18	0.16
k_4	0.09	0.28	0.40	0.27	0.25
k_5	0.06	0.25	0.25	0.38	0.21
极差 Range	0.50	0.18	0.27	0.23	0.17
最佳水平 Qptimal level	1	3	4	5	1

K_i 代表各因素 i 水平下比活力值的和；k_i 代表 Ki 的平均值。K_i is the sum of the specific activity of AChE of the i level of different factors, while k_i represents the average of K_i.

表 4　正交试验方差分析

Table 4　Analysis of the data from the orthogonal experiment with ANOVA

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square ANOVA SS	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value
A	2.6358	4	0.6590	178.48 **
B	0.3772	4	0.0943	25.54 **
C	0.6919	4	0.1730	46.85 **
D	0.6024	4	0.1506	40.79 **
E	0.2870	4	0.0718	19.44 **
误差 Error	0.1919	52	0.0037	
总和 Sum	4.7867	74		

** 极显著差异 Extremely significant difference ($P \leq 0.01$).

表 5　正交试验的 5 个影响因素各水平的差异显著性检验(SSR 检验)

Table 5　Multiple comparison of five factors in the orthogonal experiment (SSR test)

水平 Level	乙酰胆碱酯酶比活力 (10^{-3} mmol/min · mg) Specific activity of AChE				
	A	B	C	D	E
1	0.56 aA	0.13 cB	0.13 dC	0.15 cC	0.33 aA
2	0.29 bB	0.16 cB	0.17 dcC	0.14 cC	0.17 cC
3	0.12 cC	0.31 aA	0.18 cC	0.18 cC	0.16 cC
4	0.09 dcDC	0.28 abA	0.40 aA	0.27 bB	0.25 bB
5	0.06 dD	0.25 bA	0.25 bB	0.38 aA	0.21 aA

同列数据后不同小写字母和大写字母分别表示差异显著($P \leq 0.05$, SSR test)和极显著($P \leq 0.01$, SSR test)。The data followed by different small letters and capital letters within a column are significantly different ($P \leq 0.05$, SSR test) and extremely significantly different ($P \leq 0.01$, SSR test), respectively.

表 6　6 种杀虫剂与小峰熊蜂 AChE 的剂量-效应关系

Table 6　The dose-effect relationship between 6 insecticides and AChE in *Bombus hypocrita*

杀虫剂 Insecticide	抑制中浓度 (mmol/L) IC_{50} value	95% 置信限 95% Fiducial limits	斜率 Slope
毒死蜱 Chlorpyrifos	0.39	0.02 – 2.93	0.77 ± 0.07
丙溴磷 Profenofos	1.79	0.40 – 28.96	0.55 ± 0.05
三唑磷 Triazophos	0.42	0.06 – 4.83	0.77 ± 0.06
异丙威 Isoprocarb	0.04	0.01 – 0.55	0.48 ± 0.03
仲丁威 Bassa	0.43	0.08 – 4.55	0.50 ± 0.05
残杀威 Propoxur	0.63	0.12 – 4.40	0.93 ± 0.08

甲酸酯类杀虫剂易分解，所以试验过程中采用的缓冲液 pH 不宜过高；反应时间与酶活性的线性关系只在一定范围内是成立的；而温度既能改变酶反应，也能使酶变性而影响反应(Zhu and Clark, 1994；张莹等，2005a；刘洪霞等，2005；汤方等，2008；刘高云等，2009；贾玉玲等，2010；马敏等，2010)。本研究利用正交设计测定了这几个因素对小峰熊蜂乙酰胆碱酯酶活性测定的影响，明确了最佳测定条件。结果表明：在这几个因素中，酶浓度对酶活性测定的影响最大，最小的是时间，具体而言，这几个因素对 AChE 活性测定影响的大小依次为：酶浓度 > pH > 温度 > 底物浓度 > 反应时间。进一步对小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶的测定条件进行了优化，发现酶浓度 0.25 g 蛋白质/L、底物浓度 0.8 mmol/L、pH 值 7.5、温度 40℃ 反应时间 5 min 为小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶的最佳测定条件。本研究所得到的小峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶的最佳测定条件与所报道的其他生物 AChE 的测定条件有所差异，这可能与所测物种、酶液提取部位等有关。

前人研究表明，不同生物体的乙酰胆碱酯酶除测定条件不一致外，其体躯分布也不尽相同(姚洪渭等，2001；彭宇等，2002；Halappa and David, 2009)。我们在对小峰熊蜂不同部位 AChE 活性测定时也发现，小峰熊蜂头部 AChE 活性显著高于胸

部和腹部，头部 AChE 活性占总活性的64%，胸腹部活性相接近，为18%左右。这与大多数的昆虫结果都相似，因为几乎所有的昆虫的 AChE 都主要分布在神经索，大部分酶活性集中于头部。而且我们对小峰熊蜂 AChE 研究发现随着日龄变化，在15日龄前胸部 AChE 活性略高于腹部，15日龄后，则为腹部活性略高于胸部活性，但是在整个生活周期中头部 AChE 活性均显著高于胸部和腹部。这也为后期进一步对小峰熊蜂 AChE 研究，主要以头部 AChE 活性为代表提供理论依据。

前人研究结果表明可通过测定杀虫剂对昆虫 AChE 活性的抑制效果来检测杀虫剂对昆虫的毒力（Boonthai *et al.*，2000；Rickwood and Galloway，2004；Mdegela *et al.*，2010）。本试验中采用测定不同杀虫剂对 AChE 的 IC_{50}来推断有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感性。IC_{50}是指抑制50%酶活性的抑制剂浓度，IC_{50}越小，说明杀虫剂对 AChE 的抑制作用就越强，即生物体对这种杀虫剂越敏感。本研究测定的毒死蜱、丙溴磷、三唑磷、异丙威、仲丁威和残杀威6种杀虫剂对小峰熊蜂头部离体 AChE 的 IC_{50}分别为0.39，1.79，0.42，0.04，0.43和0.63 mmol/L，由此可见，异丙威是这6种杀虫剂中对 AChE 抑制作用最强的抑制剂，而丙溴磷的抑制作用最弱。

需要指出的是，本研究仅仅明确了离体情况下这些杀虫剂对小峰熊蜂 AChE 的抑制作用，无法明确相应浓度对活体蜂的作用。因此，我们将通过进一步的试验测定这些杀虫剂对小峰熊蜂的毒力，以明确活体情况下这些杀虫剂对小峰熊蜂的毒力与离体情况下这些杀虫剂对小峰熊蜂 AChE 的 IC_{50}的对应关系，最终达到测定该类杀虫剂对小峰熊蜂 AChE 的 IC_{50}就可明确该杀虫剂对小峰熊蜂毒力的目的，为合理评价以 AChE 为靶标酶的农药对小峰熊蜂的毒力及安全性提供快捷、便利的方法。同时，AChE 也是我国目前应用量最大的有机磷和氨基甲酸酯类农药的主要靶标，因此，本研究及其相应的后续研究也将为我们熊蜂授粉期间田间这类杀虫剂的合理施用、蜂群管理技术及熊蜂资源的保护提供相应的理论基础。

致谢 承蒙中国农业科学院蜜蜂研究所安建东副研究员和湖南农业大学生物安全科技学院副教授周小毛博士审阅全文并提出宝贵意见，在此深表谢意！

参考文献（References）

An JD, Huang JX, Williams PH, Wu J, Zhou BF, 2010. Species diversity and colony characteristics of bumblebees in the Hebei region of North China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21(6): 1542－1550.［安建东，黄家兴，Williams PH，吴杰，周冰峰，2010. 河北地区熊蜂物种多样性与蜂群繁育特性. 应用生态学报，21(6)：1542－1550］

An JD, Yao J, Huang JX, Shao YQ, Wu J, Li JL, Shi HY, 2008. *Bombus* fauna (Hymenoptera, Apidae) in Shanxi, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 33(1): 80－88.［安建东，姚建，黄家兴，邵有全，吴杰，李继莲，施海燕，2008. 山西省熊蜂属区系调查(膜翅目，蜜蜂科). 动物分类学报，33(1)：80－88］

Besard L, Mommaerts V, Vandeven J, Cuvelier X, Sterk G, Smagghe G, 2010. Compatibility of traditional and novel acaricides with bumblebees (*Bombus terrestris*): a first laboratory assessment of toxicity and sublethal effects. *Pest Management Science*, 66(7): 786－793.

Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE, 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785): 351－354.

Boonthai C, Scott RR, Chapman RB, 2000. Acetylcholinesterase as a biomarker to assess the effect of chlorpyrifos and atrazine on some New Zealand aquatic invertebrates. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 6(1): 59－64.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1－2): 248－254.

Brittain CA, Vighi M, Bommarco R, Settele J, Potts SG, 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, 11(2): 106－115.

Colla SR, Packer L, 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity and Conservation*, 17(6): 1379－1391.

Fournier D, Mutero A, 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108(1): 19－31.

Gao XW, 1987. Introduction of Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations modified by Gorun. *Entomological Knowledge*, 24(4): 245－246.［高希武，1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识，24(4)：245－246］

Gorun V, Proinov I, Băltescu V, Balaban G, Bărzu O, 1978. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Analytical Biochemistry*, 86: 324－326.

Gradish AE, Scott-Dupree CD, Ship PL, Harris CR, Ferguson G, 2010. Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, 66(2): 142－146.

Halappa R, David M, 2009. *In vivo* inhibition of acetylcholinesterase activity in functionally different tissues of the freshwater fish, *Cyprinus carpio*, under chlorpyrifos exposure. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 24(2-4): 123-136.

Hama H, Hosoda A, 1983. High aliesterase activity and low acetylcholinesterase sensitivity involved in organophosphorus and carbamate resistance of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology and Zoology*, 18(4): 475-485.

Jia YL, Peng HM, Peng FY, Cai Q, He M, Shi HC, 2010. Preparation of acetylcholinesterase by crucian carp brain and its sensitivity to several organophosphorus pesticides. *Environmental Science and Technology*, 33(6): 23-27. [贾玉玲，彭惠民，彭方毅，蔡强，何苗，施汉昌，2010. 鲫鱼脑 AChE 制备及对几种有机磷农药敏感性研究. 环境科学与技术，33(6): 23-27]

Liu GY, Yu W, Lu Y, Deng LF, Li WX, 2009. Kinetic characters and sensitivity to niclosamide of acetylcholinesterase of *Oncomelania hupensis*. *Agrochemicals*, 48(8): 564-567. [刘高云，余蔚，吕勇，邓灵福，李文新，2009. 钉螺乙酰胆碱酯酶的动力学特性及对氯硝柳胺的敏感性. 农药，48(8): 564-567]

Liu HX, Shi XY, Gao XW, 2005. Establishment of optimization of assaying activity of acetylcholinesteras from *Chironomus kiiensis* and their sensitivity to organophosphate insecticides. *Journal of Safety and Environment*, 5(5): 67-70. [刘洪霞，史雪岩，高希武，2005. 摇蚊乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立及有机磷类药剂敏感度比较. 安全与环境学报，5(5): 67-70]

Ma M, Zhang B, Ge YZ, Li SC, 2010. Establishment of optimization of assaying activity of acetylcholinesterase from cephalothorax of *Pardosa astrigera* and their sensitivity to pesticides. *Journal of Safety and Environment*, 10(3): 1-4. [马敏，张宾，葛衍珍，李生才，2010. 星豹蛛头胸部乙酰胆碱酯酶最佳反应体系及其药剂敏感度. 安全与环境学报，10(3): 1-4]

Mdegela RH, Mosha RD, Sandvik M, Skaare JU, 2010. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology*, 19(5): 855-863.

Morandin LA, Winston ML, 2003. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environmental Entomology*, 32(3): 555-563.

Morandin LA, Winston ML, Franklin MT, Abbott VA, 2005. Lethal and sub-lethal effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). *Pest Management Science*, 61(7): 619-626.

Peng WJ, Huang JX, Wu J, An JD, 2009. Geographic distribution and bionomics of six bumblebee species in North China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 115-120. [彭文君，黄家兴，吴杰，安建东，2009. 华北地区六种熊蜂的地理分布及生态习性. 昆虫知识，46(1): 115-120]

Peng Y, Wang YC, Han ZJ, Chen CK, Li GQ, 2002. Distribution and purification of acetylcholinesterase in *Chilo suppressalis*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 209-214. [彭宇，王荫长，韩召军，陈长琨，李国清，2002. 二化螟体内乙酰胆碱酯酶的分布及纯化方法. 昆虫学报，45(2): 209-214]

Rickwood CJ, Galloway TS, 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*, 67(1): 45-56.

Tang F, Yang HJ, Gao XW, Yan AJ, 2008. Establishment of optimization of assaying activity of acetylcholinesterase from *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae) and their sensitivity to insecticides. *Acta Entomologica Sinica*, 51(7): 714-719. [汤方，杨海江，高希武，严敖金，2008. 黑翅土白蚁乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立及药剂敏感度比较. 昆虫学报，51(7): 714-719]

Williams PH, An JD, Huang JX, Yao J, 2010. A new initiative to document Chinese bumble bees for pollination research. *Journal of Apiculture Research and Bee World*, 49(2): 221-222.

Williams PH, Osborne JL, 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40(3): 367-387.

Wu J, An JD, Yao J, Huang JX, Feng XQ, 2009. *Bombus* fauna (Hymenoptera, Apidae) in Heibei, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 34(1): 87-97. [吴杰，安建东，姚建，黄家兴，冯学全，2009. 河北省熊蜂属区系调查(膜翅目,蜜蜂科). 动物分类学报，34(1): 87-97]

Wu J, Li JL, Peng WJ, Hu FL, 2009. Sensitivities of three bumblebee species to four pesticides applied commonly in greenhouses in China. *Insect Science*, 17(1): 67-72.

Wu J, Shao YQ, An JD, Huang JX, 2007. Distribution and bionomics of *Bombus hypocrita* Pérez in North China. *Apiculture of China*, 58(12): 5-8. [吴杰，邵有全，安建东，黄家兴，2007. 华北地区小峰熊蜂的分布及其生态特性. 中国蜂业，58(12): 5-8]

Yao HW, Jiang CY, Ye GY, Cheng JA, 2001. Distribution patterns of carboxylesterase and acerylcholinesterase in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)* 27(1): 5-10. [姚洪渭，蒋彩英，叶恭银，程家安，2001. 白背飞虱羧酸酯酶与乙酰胆碱酯酶的体躯与亚细胞分布特征. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，27(1): 5-10]

Zhang Y, Huang J, Gao XW, 2005a. Comparison of the head acetylcholinesterase sensitivity to insecticides between two honeybee populations. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 7(3): 221-226. [张莹，黄建，高希武，2005a. 两种蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶对杀虫药剂敏感度比较. 农药学学报，7(3): 221-226]

Zhang Y, Huang J, Gao XW, 2005b. The optimization of conditions for assaying activity of acetylcholinesterase from the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spinola) by orthogonal matrix method. *Acta Entomologica Sinica*, 48(4): 627-632. [张莹，黄建，高希武，2005b. 正交试验法确定测定意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶反应的最佳条件. 昆虫学报，48(4): 627-632]

Zhu KY, Clark JM, 1994. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(5): 453-461.

（责任编辑：赵利辉）